



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 48 211 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 197 48 211.2
⑳ Anmeldetag: 31. 10. 97
㉑ Offenlegungstag: 6. 5. 99

⑤ Int. Cl.⁶:
G 02 B 23/12
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28
G 01 N 21/64
G 01 N 21/59
G 01 N 21/76
G 01 N 35/00

DE 197 48 211 A 1

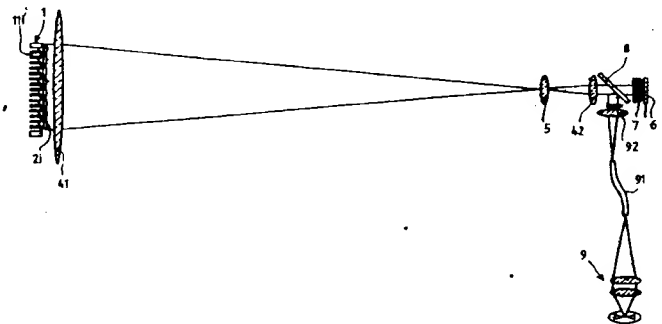
⑦1 Anmelder:
Fa. Carl Zeiss, 89518 Heidenheim, DE

⑦2 Erfinder:
Völcker, Martin, Dr., 89551 Königsbronn, DE; Liegel,
Jürgen, Dr., 73447 Oberkochen, DE; Gluch, Martin,
Dr., 07743 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Optisches Array-System und Reader für Mikrotiterplatten

⑤7 Ein optisches System mit Linsenarrays (2i, 7) und normalen Linsen (41, 5, 42) ist besonders geeignet als massiv paralleler (ca. 10^2 Kanäle) Reader für Mikrotiterplatten (1) und dergleichen in Absorption, Fluoreszenz und Lumineszenz.



DE 197 48 211 A 1

Die Erfindung betrifft ein optisches System zur Erfassung eines Gegenstandsarrays, besonders in der Ausführung als "Reader" für Mikrotiterplatten.

In der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung wie in der molekularmedizinischen Diagnose werden Fluoreszenz-, Lumineszenz- und Absorptions-Untersuchungen von riesigen Zahlen kleinster Probenmengen benötigt. Hierbei ist ein hoher Probendurchsatz bei der Messung von größter Bedeutung.

Besonders anspruchsvoll sind Kinetikmessungen, deren Zeitkonstanten einem hohen Durchsatz im Wege stehen.

Zur Bereitstellung der Proben stehen Mikrotiterplatten mit gerastert angeordneten Kleinst-Probenbehältern in Standard-Ausführungen mit z. B. 96 oder einem Vielfachen davon, z. B. 384 oder 1536, Probenbehältern (Multi-Well-Microplatten) zur Verfügung. Alternativ sind auch sogenannte Substanz-Chips als Probenträger in Gebrauch.

Ein derartiger Reader wird beispielsweise von der Firma Molecular Devices Corp. USA unter der Bezeichnung SPECTRAMax(R) PLUS angeboten. Eine Lichtquelle und ein Monochromator sind über 8 Lichtleitfasern mit 8 Spiegeloptiken zur Durchlichtbeleuchtung jeweils eines Probenbehälters und mit 8 messenden Photodetektoren verbunden. Es ist also eine achtfache Parallelmessung möglich.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine optische Anordnung anzugeben, die es ermöglicht, einen derartigen Reader mit massiv paralleler Messung auszustatten und so den Probendurchsatz auch bei Kinematikmessungen massiv zu steigern. Dabei soll ein hoher Wirkungsgrad der Lichtwege und ein kompakter, möglichst einfacher Aufbau erreicht werden.

Selbstverständlich ist eine hohe Meßempfindlichkeit zu gewährleisten.

Ein optisches System nach Anspruch 1 löst diese Aufgabe. Es wird zur Detektion ein Detektorarray vorgesehen, das z. B. als CCD-Array zur Verfügung steht. Klassische Optik mit klassischen Linsen über den ganzen Querschnitt wird mit Linsen-Arrays kombiniert. Damit wird sowohl eine maßstabgerechte Abbildung des gesamten erfaßten Gegenstandsbereichs (Mikrotiterplatte) auf das CCD-Array erreicht als auch eine geeignete Abbildung von Bereichen der einzelnen Wells der Mikrotiterplatte auf das CCD-Array (zwei verschiedene Maßstäbe), bei strikter Kanaltrennung zwischen den verschiedenen Wells.

Vorteilhaft werden dabei die in den Unteransprüchen angegebenen Merkmale ergänzt. Dazu gehören ein Teleskop – einliniig über den Querschnitt –, ein Mikrolinsenarray vor dem Detektorarray und die Integration einer Auflichtbeleuchtung. Letztere ergibt mit geringstem Aufwand durch doppelte Nutzung der optischen Elemente einen besonders guten Wirkungsgrad und besondere Rauschunterdrückung dadurch, daß genau das Probenvolumen ausgeleuchtet wird, das auch vom Nachweisstrahlengang erfaßt wird.

Mit einem Lochblendenarray kann eine weitere Störungsdrückung erreicht werden.

Näher erläutert wird die Erfindung anhand der Zeichnung.

Fig. 1 zeigt schematisch eine erfindungsgemäße optische Anordnung in einer ersten Ausführung;

Fig. 2 zeigt schematisch einen erfindungsgemäßen Reader.

Die Darstellung der Fig. 1 zeigt von allen Array-Elementen jeweils nur drei Exemplare, um übersichtlich das Prinzip darstellen zu können. Eine praktische Ausführung sieht in Anpassung an gebräuchliche Mikrotiterplatten Arrays von $8 \times 12 = 96$ Elementen (Pixeln) vor.

Ein Gegenstandsarray 11, 12, 13 wird von der Mikrotiter-

platte 1 mit Vertiefungen (Wells) und darin eingelagerten Substanzproben 110, 120, 130 gebildet. Das gleiche Rastermaß weist das Mini-Linsenarray 21, 22, 23 auf, das aus konventionellen kleinen Linsen zusammengebaut ist und mit einer Brennweite von $f = 7,5$ und einer numerischen Apertur von ca. 0,6 das Licht von einem zentralen Bereich 11, 12, 13 der Proben 110, 120, 130 effektiv einsammelt. In der Zwischenbildebene im Abstand von 380 mm ist eine Lochblende 3 angeordnet, welche ein Übersprechen zwischen den einzelnen Array-Elementen unterbindet.

Das folgende Teleskop aus den Linsen 41 und 42 verkleinert den Bündeldurchmesser von 130 mm auf 15 mm in Anpassung an die Abmessungen des CCD-Arrays. Die dazwischen angeordnete Feldlinse 5 sorgt für die Abbildung des Zwischenbilds und damit des Gegenstandsarrays 11, 12, 13 auf die Elemente des CCD-Arrays 6.

Die gesamte "Kollektiv"-Optik 41, 5, 42 ist in ihrem Durchmesser nur durch die Größe der Mikrotiterplatte 1 bzw. des Gegenstandsarrays 11, 12, 13 bestimmt. Dagegen müßte eine normale CCD-Kamera mit der gleichen numerischen Apertur von 0,6 weitaus größere Linsen haben. Dies wird dadurch ermöglicht, daß die numerische Apertur des erfindungsgemäßen optischen Systems durch die Elemente 21, 22, 23 des Mini-Linsenrasters bestimmt wird.

Das wichtigste an der Anordnung ist, daß frei von Übersprechen jeder Probe 110, 120, 130 genau eine Bildzone auf dem CCD-Array entspricht.

Für Fluoreszenz- oder Absorptions-Messungen wäre eine Beleuchtungseinrichtung zu ergänzen, z. B. in der Art, wie sie mit Fig. 2 näher erläutert wird.

Für Lumineszenzmessungen ist die Anordnung der Fig. 1 bereits unmittelbar geeignet, allerdings wird dafür eine etwa zehnfache Brennweite des Linsenarrays 21, 22, 23 bevorzugt, womit das erfaßte Probenvolumen anwächst.

Die Anordnung der Fig. 2 ist als Fluoreszenz-Reader ausgelegt. Zunächst hat sie die gleichen Elemente wie die Fig. 1, nämlich Mikrotiterplatte 1 mit Wells 11i, Mini-Linsenarray 2i mit 96 Linsen, große (41) und kleine (42) Teleskoplinse, dazwischen die Feldlinse 5 und das CCD-Array 6. Abweichend kollimiert jedoch das Mini-Linsenarray 2i, es gibt keine Lochrasterplatte, jedoch ein Mikro-Linsenarray 7 unmittelbar vor dem CCD-Array 6 mit 96 Mikrolinsen, welche kollektiv in Mikrostrukturtechnik hergestellt sind und die Abbildung in die Detektorzellen des CCD-Arrays 6 bewirken.

Es wird dabei ein Rastermaß auf dem CCD-Array von etwa vierzig Detektorzellen im Durchmesser erreicht, in dem etwa ein Spot vom zwanzig Detektorzellen im Durchmesser von jedem Probenelement ausgeleuchtet wird.

Zwischen der Teleskoplinse 42 und dem Mikro-Linsenarray 7 ist ein Einkoppelspiegel 8 (dichroitischer Spiegel) angeordnet. Eine Beleuchtungseinrichtung 9 gibt über Lichtleitfasern 91 und Kondensor 92 Beleuchtungslicht auf den Spiegel 8, das über das schon beschriebene optische System genau an die Stellen auf der Mikrotiterplatte 1 geleitet wird, die auf den CCD-Detektor 6 abgebildet werden. Das Licht der Beleuchtungseinrichtung 9 wird daher optimal für die Messung ausgenutzt. Störungen durch Beleuchtung der Struktur der Mikrotiterplatte 1 und dergleichen entfallen.

Die Beleuchtungseinrichtung kann aus einer Weißlichtquelle, z. B. einer Xenon-Gasentladungslampe, bestehen, auch kombiniert mit einem Monochromator zur Ausbildung eines Spektrophotometers.

Auch eine Linienquelle, z. B. ein Laser, kommt in Frage. Mit einer diskreten Scan-Einrichtung für die Relativbewegung von Mikrotiterplatte 1 und Mini-Linsenarray 2i einschließlich der gesamten optischen Anordnung kann z. B. eine 384-Well-Mikrotiterplatte mit vier Stellungen nacheinander

ander komplett ausgelesen werden.

Übliche Filter in Beleuchtungs- und Nachweisstrahlengang zur Trennung von Beleuchtungs- und Fluoreszenzlicht können zur Anpassung an verschiedene Wellenlängen zusammen mit dem dichroitischen Spiegel in einem auswechselbaren Modul angeordnet sein und so einen schnellen Wechsel des Fluoreszenzsystems ermöglichen.

Aus dem gleichen Grund wird vorzugsweise zumindest das gegenstandsseitige Linsenarray 2i achromatisiert, indem jede einzelne Linse durch eine Linsengruppe mit achromatischer Korrektur ersetzt wird. Als Spektralbereich wird dann typischerweise etwa 350 bis 800 nm vorgesehen.

Wird der Strahlteiler 8 nicht dichroitisch ausgebildet und wird über der Mikrotiterplatte 1 ein Spiegel angeordnet, so kann einfach eine Anordnung zur Absorptionsmessung analog dem beschriebenen Gerät der Firma Molecular Dynamics abgeleitet werden. Natürlich kann auch eine Auflichtsbeleuchtung vorgesehen werden.

Die Anordnung ist konfokal in dem Sinne, daß ein in der Probe räumlich begrenzter Beleuchtungsfleck mit einem räumlich begrenzten Detektionsbereich überlagert wird. Die Blende im Beleuchtungsstrahlengang kann das Faserende oder eine Leuchtfeldblende darstellen, die Blende im Detektionsstrahlengang kann durch selektives Auslesen der CCD-Pixel im Bereich der einzelnen Beleuchtungsflecken, durch ein Lochblendenarray vor der CCD-Kamera oder durch eine Feldblende im Bereich der Feldlinse erzeugt werden.

Auch eine Durchlichtbeleuchtung kann mit dieser Konfokalität realisiert werden, wenn ein entsprechendes Linsenarray wie das Linsenarray 2i vorgesehen wird.

Bei der Ausführung als Reader für Fluoreszenzmessungen wird vorzugsweise ein Fokusbereich von 50 bis 500 µm, besonders 150 µm, bei einer numerischen Apertur von 0,6 bis 0,7 vorgesehen.

Als Reader für Lumineszenz wird der Fokusbereich besser dem Töpfchendurchmesser (Durchmesser eines Wells) von 3 bis 4 mm bei 384er Mikrotiterplatten angepaßt.

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) kann mit dem gleichen optischen Konzept parallelisiert und damit für High-Throughput-Anwendungen tauglich werden. Für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ist hier jedoch die Reduzierung des Meßvolumens in den Bereich von Femtolitern mit einem Fokusbereich von 0,1–10 µm vorteilhaft. Die minimale Korrelationszeit ist jedoch durch die Integrations- und Auslesezeit des CCD-Arrays begrenzt. Parallel auslesbare Detektor-Arrays wie APD-Arrays sind daher in dieser Anwendung zu bevorzugen.

Zur leichten Anpassung an die unterschiedlichen Meßverfahren wird daher ein modular aufgebauter Reader vorgeschlagen, bei dem das probenseitige Linsenarray 2i austauschbar ist.

Es sind damit folgende Vorteile der Erfindung hervorzuheben:

- Hohe Kanalzahl mit größenordnungsmäßig 10^2 Kanälen ist gut möglich und ergibt wirkungsvolle Parallelisierung.
- Eine hohe Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit ist durch die große mögliche Apertur der Einzellinsen 21, 22, 23 des Mini-Linsenarrays gegeben.
- Eine geringe Leistung der Lichtquelle 9 ist ausreichend, weil die Beleuchtung strukturiert erfolgt und die hohe Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit gegeben ist.
- Eine starke Unterdrückung von störender Fluoreszenz von außerhalb des Meßvolumens (typisches Meßvolumen bei Fluoreszenzmessungen für Mikrotiterplatten und 96-Kanal-Optik: wenige Nanoliter) durch die

konfokale Detektion erlaubt die Messung von homogenen Proben trotz möglicherweise starker Fluoreszenzkonzentrationen auf dem Boden durch Ausfällungen und trotz starker Eigenfluoreszenz der Böden und Wände der Wells in der Mikrotiterplatte.

- Eine Unabhängigkeit von der Füllhöhe bei Fluoreszenzmessungen wird durch die Konfokalität ebenfalls bewirkt.

- Fluoreszenzfilter und Strahlteiler mit Standardmaßen (Durchmesser im Bereich von 25 mm) können verwendet werden, da die großen Abmessungen der Mikrotiterplatten durch das Teleskop verkleinert werden (Durchmesser am CCD-Array ca. 15 mm).

- Das Übersprechen zwischen benachbarten Proben (Wells) ist durch die lokale Beleuchtung und konfokale Detektion prinzipiell gering und kann durch eine Lochmaske oder Stege zwischen den Linsenelementen der Linsenarrays und simultane Verwendung z. B. nur jedes zweiten Wells (z. B. 96-Kanal-Detektion bei 384er Mikrotiterplatten) weiter reduziert werden.

- Die Datenerfassung ist auch bei der hohen Kanalzahl durch Verwendung eines CCD-Arrays einfach.

- Flexibilität im Format ist gegeben, da das 96er Raster des Readers auch zu höher integrierten Mikrotiterplatten (z. B. 384, 864, 1536 Wells) und zu sogenannten Zell-Chips und DNA-Chips paßt.

- Kinetische Fluoreszenzmessungen werden durch die Vielkanalausführung besonders unterstützt.

- An zellbasierten Arrays können Fluoreszenzmessungen durch Fokussierung des Linsenarrays 2i auf Zellen, die auf dem Boden des Wells aufgebracht sind, durchgeführt werden. Ortsaufgelöstes Auslesen der individuellen, hier möglichst großen Spots auf der CCD mit einer Auflösung von etwa der Zellgröße oder besser erlaubt eine wesentlich detailliertere, ortsaufgelöste Analyse der biologischen Funktion der zu untersuchenden Substanz. Dieses High Content Screening (HCS) erlaubt z. B. den Vergleich der Fluoreszenzkonzentrationen außerhalb, auf und innerhalb der Zelle und im Zellkern. Auch hier ist die Kinetik wichtig.

Patentansprüche

1. Optisches System mit einem Linsenarray (21–23) und einer Feldlinse (5), das ein Gegenstandsarray (11–13) auf ein Detektorarray (61–63) abbildet.
2. Optisches System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Linsenarray (21–23) und Feldlinse (5) und dieser und dem Detektorarray (61–63) je eine Linse (41, 42) eines Teleskops angeordnet ist.
3. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1–2, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Detektorarray (6) ein Mikrolinsenarray (7) angeordnet ist.
4. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Auflichtsbeleuchtung (9, 91, 92) integriert ist.
5. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Lochblendenarray (3) zwischen Linsenarray (21–23) und Feldlinse (5) angeordnet ist.
6. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gegenstandsarray eine Mikrotiterplatte (1) gefüllt mit der zu untersuchenden Probe oder ein Substanz-Chip ist.
7. Optisches System nach mindestens einem der An-

sprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß das Detektorarray (6) ein CCD-Array oder ein Photodioden-Array ist.

8. Anordnung nach mindestens einem der Ansprüche 1-7, gekennzeichnet durch die Ausbildung als Reader für Mikrotiterplatten mit Absorption, Fluoreszenz einschließlich Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, oder Lumineszenz.

9. Spektrophotometer, dadurch gekennzeichnet, daß es ein optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-8 enthält.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

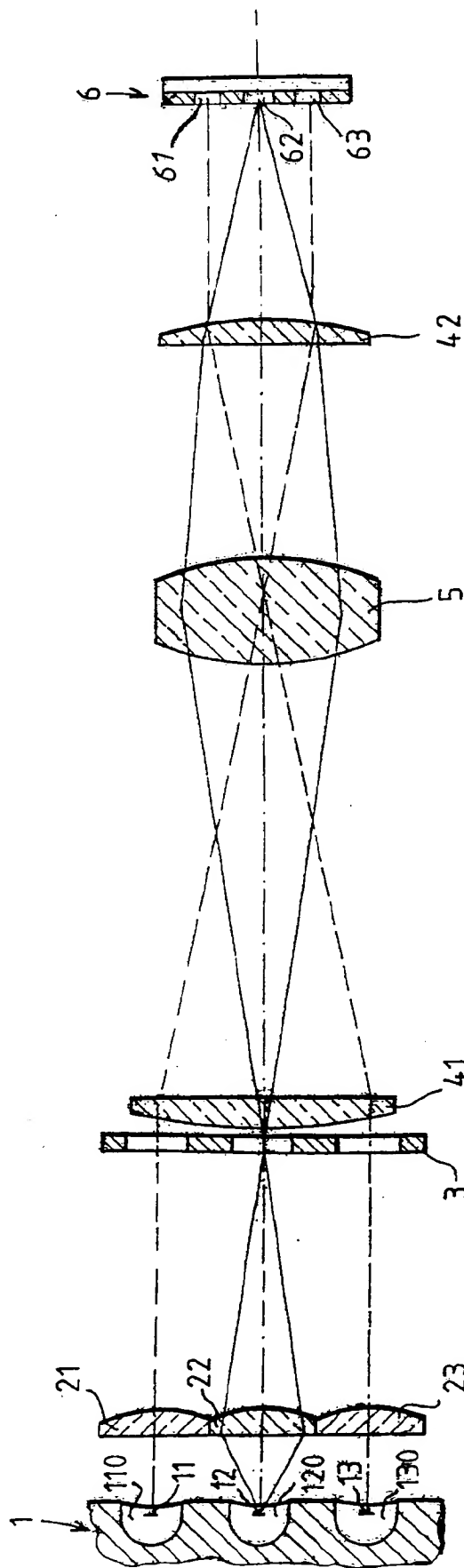


FIG. 2

